

Analisis Diversitas Genetik 53 Genotipe Padi Indonesia Menggunakan 6K Marka *Single Nucleotide Polymorphism*

(Genetic Diversity Analysis of 53 Indonesian Rice Genotypes using 6K *Single Nucleotide Polymorphism* Markers)

Joko Prasetyono*, Nurul Hidayatun, dan Tasliah

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
(0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: jokoprasetyono@yahoo.com

Diajukan: 9 Januari 2018; Direvisi: 12 April 2018; Diterima: 16 Mei 2018

ABSTRACT

Indonesia is rich in rice genetic resources, however, only a small number has been used in variety improvement programs. This study aimed to determine the genetic diversity of Indonesian rice varieties using 6K SNP markers. The study was conducted at ICABIOGRAD for DNA isolation and IRRI for SNP marker analysis. Genetic materials were 53 rice genotypes consisting of 49 varieties and 4 check genotypes. SNP markers used were 6K loci. Results showed that among the markers analyzed, only 4,606 SNPs (76.77%) were successfully read. The SNP markers covered all twelve rice chromosomes of 945,178.27 bp. The most common allele observed was GG, whereas the least allele was TG. Dendrograms of the 53 rice varieties analyzed with 4,606 SNPs demonstrated several small groups containing genotypic mixtures between *indica* and *japonica* rice, and no groups were found to contain firmly *indica* or *japonica* type. Structure analysis ($K = 2$) with value of 0.8 showed that the 53 rice varieties were divided into several groups and each group consisted of 4 *japonica*, 2 *tropical japonica*, 46 *indica*, and 1 *aus* rice type, respectively. IR64 and Ciherang proved to have an *indica* genome, while Rojolele has *japonica* one. Dupa and Hawara Bunar, usually grouped into *tropical japonica* rice, were classified as *indica* type, and Hawara Bunar has perfectly 100% *indica* type. The results of this study indicated that rice classification (*indica-japonica*) which is usually classified based only on morphological characters, e.g. grain and leaf shapes, is not enough and classification based on SNP markers should be considered for that purpose.

Keywords: Rice, SNP, genetic diversity, *indica*, *japonica*.

ABSTRAK

Indonesia memiliki keragaman genetik padi yang tinggi, tetapi baru sebagian kecil yang telah dimanfaatkan untuk program pemuliaan. Penelitian ini bertujuan mengetahui keragaman genetik varietas unggul Indonesia yang telah dilepas menggunakan 6K marka SNP. Penelitian dilakukan di BB Biogen untuk isolasi DNA dan IRRI untuk deteksi marka SNP. Materi genetik yang digunakan adalah 53 genotipe padi, terdiri atas 49 varietas unggul dan 4 genotipe padi cek. Marka SNP yang digunakan sebanyak 6K lokus. Hasil penelitian menunjukkan dari 6K marka SNP yang dianalisis, sebanyak 4.606 marka (76,77%) berhasil terbaca. Marka SNP tersebut tersebar pada dua belas kromosom dengan panjang total 945.178,27 bp. Alel terbanyak yang muncul adalah GG dan yang paling sedikit adalah TG. Dendrogram 53 varietas hasil analisis menggunakan 4.606 marka SNP menunjukkan beberapa kelompok berisi campuran padi tipe *indica* dan *japonica*. Tidak ada kelompok yang secara tegas berisi padi tipe *indica* atau *japonica* saja. Analisis *STRUCTURE* ($K = 2$) pada nilai 0,8 membagi 53 varietas padi ke dalam beberapa kelompok dan tiap kelompok berturut-turut terdiri atas 4 genotipe tipe *japonica*, 2 genotipe tipe *tropical japonica*, 46 genotipe tipe *indica*, dan 1 genotipe tipe *aus*. IR64 dan Ciherang terbukti memiliki genom *indica*, sedangkan Rojolele memiliki genom tipe *japonica*. Dupa dan Hawara Bunar yang biasanya dikelompokkan ke dalam tipe *tropical japonica*, ternyata termasuk tipe *indica*. Hawara Bunar memiliki 100% tipe *indica*. Hasil penelitian ini menunjukkan pengelompokan tipe padi (*indica-japonica*) yang hanya didasarkan pada karakter morfologis, seperti bentuk bulir dan bentuk daun, belum cukup. Penggunaan marka SNP patut dipertimbangkan untuk tujuan tersebut.

Kata kunci: Padi, SNP, keragaman genetik, *indica*, *japonica*.

PENDAHULUAN

Kekayaan plasma nutfah padi di dunia sangat besar. Tercatat hingga tahun 2017, koleksi padi di IRRI mencapai 127.916 aksesi dan 4.647 kerabat liar (*wild relative*). Berbagai genotipe padi, baik yang telah dilepas maupun jenis padi lokal, dikirim ke IRRI dari hampir seluruh belahan dunia. Genotipe padi lokal yang beradaptasi baik pada lokasi spesifik merupakan genotipe padi yang dikhawatirkan paling rentan punah karena pada proses budi dayanya petani cenderung menggunakan varietas unggul modern dan mengesampingkan varietas lokal. IRRI juga mengonservasi 24 spesies padi liar dan 9 spesies dari 7 genus yang terkait yang masih dianggap berkerabat dengan padi (IRRI 2017). Bank Gen Balitbangtan mempunyai koleksi padi sebanyak 3.300 aksesi (Bank Gen Balitbangtan 2017, belum dipublikasikan). Jumlah ini masih akan terus bertambah seiring peningkatan keragaman genetik padi, baik yang terjadi secara alami maupun keragaman yang sengaja dibuat melalui program persilangan, mutasi, dan/atau rekayasa genetika.

Keragaman genetik padi, padi budi daya khususnya, terkadang sulit untuk dibedakan secara morfologis karena program pemuliaan pada perakitan varietas padi umumnya dilakukan dengan menggunakan materi genetik dengan keragaman genetik yang sempit, bahkan kadang-kadang latar belakang genetik tetua yang digunakan dalam persilangan sangat mirip secara genetik. Sebagai contoh, varietas Ciherang dan Code merupakan turunan IR64, demikian pula Inpari 30 yang merupakan turunan Ciherang (Romdon et al. 2014). Oleh karena itu, diperlukan adanya analisis kekerabatan genetik menggunakan marka DNA agar dapat mendeteksi perbedaan genetik varietas-varietas tersebut secara lebih akurat. Identifikasi plasma nutfah padi dengan marka molekuler telah lama dilakukan pemulia padi di dunia, seperti yang dilaporkan oleh Ge et al. (1999) yang menggunakan marka *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) untuk membedakan *Oryza rufipogon* dari Cina dan Brazil. Marka mikrosatelit atau *Simple Sequence Repeat* (SSR) telah digunakan untuk menganalisis keragaman genetik antargalur/varietas dan spesies (Tasliyah et al. 2011; Salgotra et al. 2015; Masuduzzaman et al. 2016). Marka lainnya, seperti *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP), termasuk marka gen spesifik, juga telah digunakan pada analisis keragaman genetik berbagai genotipe padi. Marka *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) merupakan salah satu marka molekuler yang belakangan ini berkembang dengan pesat seiring

dengan perkembangan dan kemajuan teknologi sekuensing genom menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS).

Marka SNP menunjukkan perbedaan satu basa pada lokasi tertentu di antara aksesi padi yang kemudian dapat dimanfaatkan untuk berbagai macam analisis genetik (Mammadov et al. 2012). Jumlah SNP dalam genom tanaman sangat berlimpah dan sistem deteksinya dapat diotomatisasi (Tasma 2014). Chen et al. (2014), melaporkan dari penajaran data sekuen 801 varietas padi, diperoleh sekitar 10.000.000 lokus SNP. Di samping jumlahnya yang melimpah dalam genom, lokasinya juga tersebar cukup merata dalam kromosom padi. Namun, hingga saat ini jumlah marka SNP untuk padi yang telah diverifikasi dan dapat diaplikasikan untuk analisis genetik dan untuk tujuan pemuliaan tanaman masih kurang dari 10.000 marka (Yu et al. 2014). Tentu tidak semua SNP yang ditemukan dalam genom padi dapat dibuat markanya. Marka tersebut harus dapat mengenali lokus dalam kondisi homozigot dan heterozigot (Mammadov et al. 2012). Pada padi, pembuatan *chip* SNP biasanya mengakomodasi tipe-tipe padi di dunia, termasuk genotipe-genotipe padi asal Indonesia, sehingga marka *chip* SNP yang disintesis diharapkan dapat dikenali oleh sebagian besar genom padi di dunia (McCouch et al. 2010).

Karena sistem deteksinya dapat diotomatisasi, aplikasi marka SNP di laboratorium dapat dilakukan dengan cepat, lebih mudah, dan lebih akurat dibandingkan dengan deteksi marka mikrosatelit, serta biaya per unit data marka yang dikeluarkan lebih kompetitif dibanding dengan deteksi satu unit data marka mikrosatelit. Jumlah marka yang dapat digunakan jauh lebih banyak pada marka SNP dibandingkan dengan marka SSR. Gonzaga et al. (2015) melaporkan tingkat polimorfisme (berdasarkan nilai PIC) marka mikrosatelit lebih tinggi dibanding dengan marka SNP pada 23 genotipe padi tipe *indica*. Nilai PIC maksimum dari dua belas kromosom yang dianalisis menunjukkan untuk marka SSR sebesar 0,563–0,830, sedangkan untuk marka SNP sebesar 0,490–0,580. Namun, karena jumlah marka SNP dan jumlah genotipe yang dapat dianalisis per satuan waktu jumlahnya jauh lebih banyak daripada menggunakan marka SSR, marka yang informatif untuk analisis genetik yang dihasilkan dari *chip* SNP juga jauh lebih tinggi sehingga analisis genetik marka *chip* SNP lebih akurat, lebih informatif, dan lebih komprehensif (Tasma 2014).

Seperti halnya marka SSR, tujuan penggunaan marka SNP ini di antaranya untuk menganalisis keragaman genetik aksesi padi seperti padi lokal di

India (Singh et al. 2013) dan padi *japonica-indica* (Wang et al. 2009; Kim dan Tai 2013), perbedaan alel yang dimiliki antara padi yang toleran kekeringan dan yang sensitif (Parida et al. 2012), keragaman kultur antera (Jeong et al. 2013), dan pemetaan QTL karakter penting pada padi seperti bentuk daun (Lestari et al. 2016) dan bentuk bulir (Hu et al. 2013). Kim et al. (2009) menyusun informasi yang memuat 175 QTL pada padi yang telah dihasilkan dengan menggunakan marka SNP. McNally et al. (2009) melaporkan marka SNP mampu menjelaskan dengan baik adanya hubungan kekerabatan antara padi lokal (*landrace*) dan padi modern saat ini.

Penggunaan marka SNP untuk analisis genetik berbagai genotipe dan program pemuliaan padi di Indonesia juga telah mulai banyak dilakukan (Utami et al. 2013; Utami 2014; Prasetyono dan Hidayatun 2017). Marka-marka SNP yang dapat diaplikasikan untuk pemuliaan juga menjadi target untuk menjadi marka yang aplikatif untuk program pemuliaan (Chen et al. 2011). Penelitian ini bertujuan mengetahui keragaman genetik varietas unggul Indonesia yang telah dilepas menggunakan 6.000 (6K) marka SNP.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di dua lokasi, yakni Laboratorium Biologi Molekuler, BB Biogen, Bogor untuk kegiatan isolasi DNA, dan IRRI, Filipina untuk analisis SNP yang dilakukan pada bulan Agustus sampai dengan Desember 2014. Materi genetik yang digunakan adalah 53 genotipe padi, terdiri atas 49 varietas unggul yang telah dilepas dan 4 genotipe padi cek lokal atau introduksi (Tabel 1). Sebagai kontrol untuk analisis padi tipe *indica* digunakan varietas IR64, kontrol untuk tipe *japonica* adalah Nipponbare, dan kontrol untuk tipe *aus* adalah Kasalath. Marka SNP yang digunakan adalah *chip* SNP padi 6K yang mengandung 6.000 marka SNP.

Isolasi DNA Genomik

DNA genomik diisolasi menggunakan metode Dellaporta et al. (1983). DNA 53 genotipe padi yang dianalisis diisolasi dari daun muda dan segar. DNA hasil isolasi langsung dikeringkan dan tabung mikro ditutup dengan parafilm. DNA tersebut kemudian dibawa ke IRRI.

Analisis 53 Genotipe Padi Indonesia Menggunakan Marka SNP

Sampel DNA yang telah berada di IRRI dilarutkan kemudian dicek kualitas dan kuantitasnya. Konsentrasi sampel DNA masing-masing diatur menye-

uaikan dengan kebutuhan untuk analisis SNP. Marka SNP yang digunakan pada penelitian ini merupakan SNP yang tersebar pada seluruh kromosom padi. Teknologi yang digunakan adalah *Infinium* (Illumina) yang dapat mendeteksi SNP hingga ribuan dalam satu *chip*. *Beadchip* yang disusun sebanyak 6K marka SNP yang didesain oleh grup Dr. Susan McCouch (Cornell University). Setiap *bead* (*array*) mencerminkan satu lokus SNP. Saat ini, IRRI juga telah mengembangkan *chip* SNP hingga 7K dengan berbagai kelebihan, namun dengan harga yang ekonomis (IRRI Genotyping Services Laboratory 2017).

Analisis Data

Data genotipe marka SNP 53 genotipe padi yang diperoleh berupa basa DNA (AA, AG, AC, dst.) diolah menggunakan program *PowerMarker*. Matriks jarak genetik dihitung menggunakan rumus yang dideskripsikan oleh Nei et al. (1983) dengan metode pengelompokan *Unweighted Pair Group Method based on Arithmetic Mean* (UPGMA), dilanjutkan analisis *bootstrap* yang ada di dalam program *PowerMarker* (Liu dan Muse 2005). Visualisasi dendrogram dilakukan dengan menggunakan program *TreeView*. Analisis pola alel dilakukan dengan menggunakan program *Flapjack* (Milne et al. 2010).

Analisis struktur populasi 53 genotipe padi yang telah dianalisis menggunakan 6K marka SNP dilakukan dengan menggunakan program *STRUCTURE* versi 2.3.4 (Stanford University 2012). Pada penelitian ini, analisis dilakukan dengan menggunakan sepuluh pengulangan ($K = 1-10$) dengan setiap ulangan dilakukan iterasi/pengulangan sebanyak 10.000 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaan Marka SNP

Dari 6.000 lokus SNP yang digunakan pada analisis ini ternyata hanya 4.606 marka saja yang dapat dibaca oleh alat pembaca (i-Scan™). Sebanyak 1.394 marka (23,23%) tidak dapat dibaca. Hal ini mungkin disebabkan SNP yang digunakan adalah SNP yang bersifat acak dan tersebar di seluruh kromosom padi sehingga ada yang tidak kompatibel dengan sampel yang digunakan pada penelitian ini. Selain itu, mungkin dikarenakan proses verifikasi dan validasi SNP masing-masing belum dilakukan semuanya. Biasanya, setiap marka SNP yang telah didesain harus divalidasi lagi untuk mengetahui kompatibilitas dengan genom individu/spesies yang akan digunakan.

Tabel 1. Lima puluh tiga genotipe padi yang digunakan pada penelitian ini.

Genotipe	Tahun dilepas dan/atau negara/daerah asal	Jenis (habitat)
Kasalath	Padi lokal India	Padi gogo, cek <i>aus</i>
Nipponbare	Padi Jepang	Padi sawah, cek <i>japonica</i>
Hawara Bunar	Sumatra Selatan	Padi gogo
Dupa	Kabupaten Paser, Kalimantan Timur	Padi gogo
Seratus Malam	1960	Padi gogo
Kartuna	1963	Padi gogo
Pelita I-2	1971	Padi sawah
IR74	1971	Padi sawah
IR20/PB-20	1974	Padi sawah
Gata	1976	Padi gogo
IR36	1977	Padi sawah
Cisadane	1980	Padi sawah
Krueng Aceh	1981	Padi sawah
Sentani	1983	Padi gogo
Singkarak	1983	Padi gogo
Tondano	1983	Padi gogo
Arias	1984	Padi gogo
Ranau	1984	Padi gogo
Maninjau	1985	Padi gogo
IR64	1986	Padi sawah, cek <i>indica</i>
Jangkak	1987	Padi sawah
Dodokan	1987	Padi gogo
Danau Bawah	1987	Padi gogo
Danau Atas	1988	Padi gogo
C-22	1989 (introduksi)	Padi gogo
Batur	1988	Padi gogo
Laut Tawar	1989	Padi gogo
Poso	1989	Padi gogo
Danau Tempe	1991	Padi gogo
Situ Gintung	1992	Padi gogo
Gajah Mungkur	1994 (introduksi)	Padi gogo
Jati Luhur	1994	Padi gogo
Kalimutu	1994 (introduksi)	Padi gogo
Towuti	1999	Padi gogo
Limboto	1999	Padi gogo
Way Rarem	1994	Padi gogo
Ciherang	2000	Padi sawah
Angke	2001	Padi sawah
Code	2001	Padi sawah
Danau Gaung	2001	Padi gogo
BatuTegi	2001	Padi gogo
Silugonggo	2001	Padi gogo
Situ Bagendit	2003	Padi gogo/sawah
Rojolele	2003 (lokal Delanggu, Jawa Tengah)	Padi sawah
Mekongga	2004	Padi sawah
Pandan Wangi	2004 (lokal Cianjur, Jawa Barat)	Padi sawah
Inpari 13	2009	Padi sawah
Inpago 4	2010	Padi gogo
Inpago 5	2010	Padi gogo
Inpago 6	2010	Padi gogo
Inpago 7	2011	Padi gogo
Inpago 8	2011	Padi gogo
Inpago 9	2012	Padi gogo

Nilai PIC yang dihasilkan dari analisis 4.606 marka SNP pada 53 genotipe padi berkisar dari 0,00 sampai dengan 0,588. Menurut Botstein et al. (1980) nilai PIC >0,5 memberikan informasi tinggi, nilai PIC antara 0,25–0,5 memberikan informasi sedang, dan nilai PIC <0,25 memberikan informasi sedikit. Sebanyak 96 marka SNP pada penelitian ini memiliki nilai

PIC >0,5 sehingga dapat memberikan variasi yang besar. Nilai PIC yang rendah dimiliki oleh 2.355 marka SNP, sedangkan nilai PIC yang sedang dimiliki oleh 2.155 marka.

Frekuensi alel mayor yang diperoleh berkisar antara 0,3654–1,0000, jumlah genotipe 1–4, jumlah alel 1–3, keragaman genetik 0,00–0,6635, dan heterozigositas 0,00–0,9038. Berdasarkan pola alel,

jumlah alel jarang/alel minor (frekuensi <5%) sebanyak 10.972 alel, jumlah alel sedang (frekuensi 5–30%) sebanyak 44.916 alel, dan jumlah alel yang kemunculannya sering (frekuensi >30%) sebanyak 432.348 alel. Rangkuman pola sebaran marka SNP yang digunakan pada setiap kromosom padi disajikan pada Tabel 2.

Alel yang terdeteksi sebagian besar berada dalam kondisi homozigot, yakni GG, CC, AA, dan TT, sebagian kecil AG, TG, TC, dan AC, sementara alel AT, TA, CA, CT, CG, GA, GT, dan GA sama sekali tidak terdeteksi (Tabel 3). Hal ini menunjukkan genotipe yang telah dianggap seragam (sebagai varietas) umumnya memiliki alel homozigot, namun alel heterozigot juga masih ditemukan. Hal ini menunjukkan genotipe padi yang digunakan pada penelitian ini tidak memiliki alel homozigot 100%, meskipun sebagai varietas elit yang telah dilepas. Terdapat penyimpangan berupa alel heterozigot kurang dari 5%.

Diversitas Genetik 53 Genotipe Padi

Analisis diversitas genetik 53 genotipe padi dilakukan dengan dua cara, yakni membuat dendro-

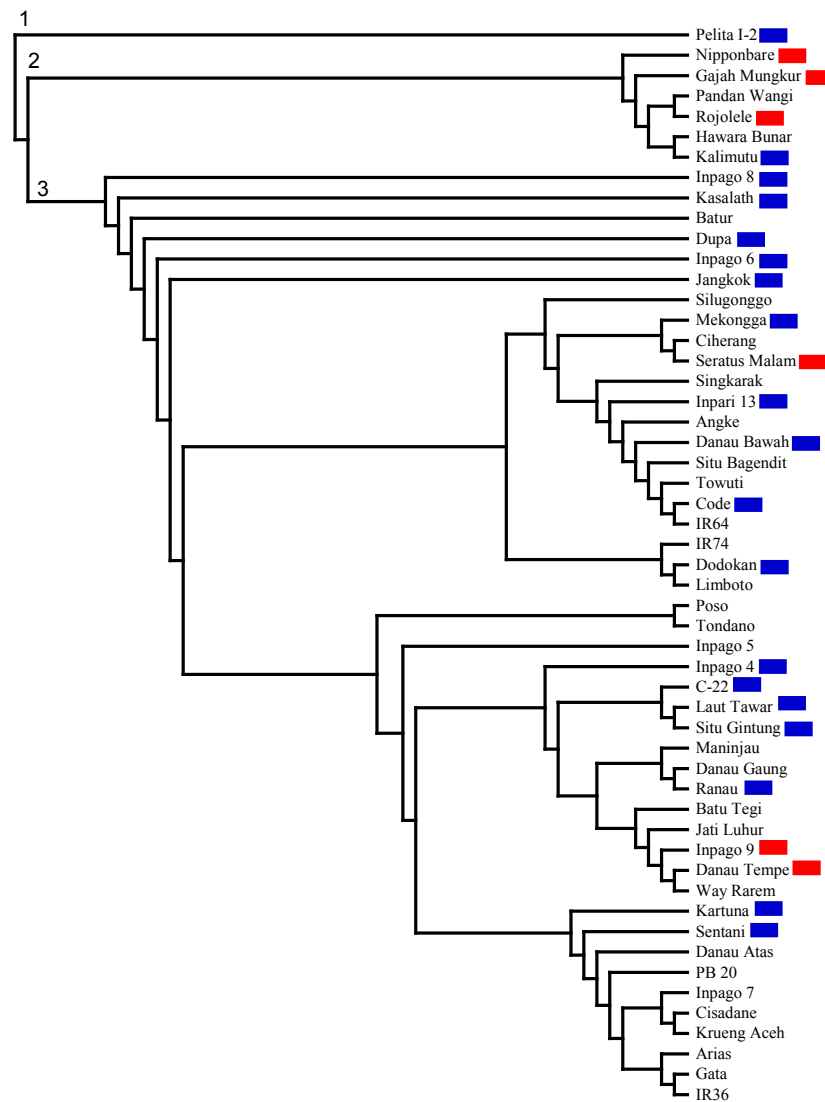
gram dan menganalisis struktur genetik varietas masing-masing. Berdasarkan dendrogram yang dihasilkan (Gambar 1), dendrogram dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok 1, 2, dan 3. Kelompok 1 dan 2 didominasi oleh padi-padi tipe *japonica* dan campuran *indica-japonica*. Kelompok 3 didominasi oleh padi tipe *indica*, walaupun di dalam kelompok 3 terdapat kelompok-kelompok kecil yang berisi padi *japonica*, *indica*, dan campuran *indica-japonica*. Beberapa dendrogram yang dihasilkan dengan koefisien kesamaan yang berbeda dan metode pengelompokan yang lain juga menunjukkan ketidakteraturan pengelompokan antar subspecies padi tersebut (data tidak ditampilkan). Dendrogram pada Gambar 1 merupakan salah satu dendrogram yang sesuai dengan pengelompokan yang diharapkan, yaitu genom tanaman cek *indica*, cek *japonica*, dan cek *aus* lokasinya terpisah satu dengan yang lainnya pada dendrogram. Di samping itu, biasanya dendrogram padi tipe *japonica* dan *indica* akan terpisah secara tegas. Tasliyah et al. (2011) berhasil mengelompokkan padi tipe *japonica* dengan padi tipe *indica* dengan menganalisis 40 genotipe ber-

Tabel 2. Sebaran marka SNP hasil penelitian ini pada setiap kromosom padi.

Kromosom	Jumlah marka SNP per kromosom	Kisaran panjang basa pada setiap kromosom (bp)	Panjang basa total pada setiap kromosom (bp)	Rerata jarak antarmarka SNP (bp)
1	514	194.844–42.977.252	42.782.408	83.234,26
2	457	134.511–35.691.840	35.557.329	77.805,97
3	486	398.385–35.824.356	35.425.971	72.892,94
4	421	247.628–34.935.052	34.687.424	82.392,93
5	378	255.323–25.584.298	25.328.975	67.007,87
6	376	346.639–30.918.058	30.571.419	81.306,97
7	367	184.193–29.186.584	29.002.391	79.025,59
8	345	250.632–28.058.830	27.808.198	80.603,47
9	300	348.460–22.680.524	22.332.064	74.440,21
10	276	146.531–23.033.344	22.886.813	82.923,24
11	346	256.688–28.958.988	28.702.300	82.954,62
12	340	119.957–27.520.624	27.400.667	80.590,20
Total	4.606		362.485.959	945.178,27
Rerata	383,83		30.207.163,25	78.764,86

Tabel 3. Pola alel yang muncul hasil analisis 4.606 marka SNP pada 53 genotipe padi yang diuji.

Pola alel	Kromosom												Total	%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
GG	7.939	6.484	6.434	6.401	5.018	5.186	5.272	5.159	4.279	3.530	5.043	4.567	65.312	26,8
AA	5.540	5.356	5.760	3.897	4.565	3.980	3.792	3.409	3.201	2.607	3.610	3.277	48.976	20,1
CC	6.210	6.270	6.645	5.441	5.160	5.324	4.980	4.337	3.931	4.179	4.588	4.605	61.560	25,2
TT	5.241	4.311	5.041	4.308	3.864	3.598	3.534	3.684	2.911	3.029	3.082	3.484	46.087	18,9
AG	524	358	329	412	248	359	394	300	235	168	308	325	3.960	1,6
---	1.232	894	960	1.298	801	906	960	1.041	969	772	1.276	1.331	12.440	5,1
TC	341	355	326	364	238	343	262	302	236	242	236	271	3.519	1,4
TG	106	61	100	117	44	125	130	68	56	48	94	78	1.027	0,4
AC	109	132	163	93	96	107	127	95	82	53	101	82	1.240	0,5
Total	27.242	24.221	25.758	22.331	20.034	19.928	19.451	18.395	15.900	14.628	18.338	18.020	244.121	



Gambar 1. Dendrogram 53 genotipe padi hasil analisis menggunakan 4.606 marka SNP. Dendrogram di-konstruksi menggunakan koefisien kesamaan dan metode UPGMA dilanjutkan dengan analisis *bootstrap* pada program *PowerMarker*. Warna merah menunjukkan varietas dengan genom 100% menyerupai padi tipe *japonica*. Warna biru menunjukkan varietas dengan genom campuran padi tipe *indica* dan *japonica*. Yang tidak diberi warna berarti memiliki 100% genom padi tipe *indica*.

bagai tipe padi menggunakan 39 marka mikrosatelit. Temuan serupa juga telah dilaporkan oleh Zhang et al. (2011) yang menganalisis 150 genotipe padi menggunakan 274 marka mikrosatelit. Perbedaan tipe marka ini mungkin yang menyebabkan hasil pengelompokan berbeda. Hasil amplifikasi marka mikrosatelit memiliki ukuran 100–500 bp, sedangkan marka SNP berdasarkan perbedaan satu basa saja. Basa yang lebih panjang pada mikrosatelit mungkin menyebabkan perbedaan pengelompokan genom padi tipe *indica-japonica* dapat lebih tegas karena setiap tipe memiliki pola tersendiri (berbentuk pita DNA), sedangkan pada marka SNP perbedaan hanya satu basa saja, sementara pola basa hanya ada empat (A,

G, T, C) sehingga kombinasi basa yang dihasilkan tidak banyak, satu tipe basa dapat dimiliki oleh genom tipe *indica* ataupun *japonica*.

Berbeda dengan marka mikrosatelit, pengelompokan padi *indica-japonica* yang menggunakan marka SNP menghasilkan dendrogram yang tidak terlalu tegas membedakan padi *indica-japonica*. Ini mengindikasikan bahwa genom padi tipe *japonica* masih tersisip dalam genom padi tipe *indica*. Hasil yang mirip juga dilaporkan oleh Utami et al. (2013) yang menganalisis 467 genotipe padi menggunakan 1.536 marka SNP yang menghasilkan kelompok tipe *tropical japonica*, kelompok tipe *japonica*, campuran tipe *indica-tropical japonica*, campuran tipe *indica-*

japonica, campuran tipe *indica*-*O. rufipogon*, dan kelompok tipe *indica*.

Analisis Struktur Populasi

Untuk melihat komposisi genom setiap genotipe padi yang dianalisis pada penelitian ini, dilakukan analisis struktur populasi menggunakan program *STRUCTURE* versi 2.3.4. Analisis dilakukan dengan menggunakan sepuluh pengulangan ($K = 1-10$), dengan setiap ulangan dilakukan iterasi/pengulangan sebanyak 10.000 kali. Berdasarkan grafik K yang dihasilkan, nilai $K = 2$ merupakan grafik terbaik karena memberikan ΔK yang tertinggi (data tidak ditampilkan). Keragaan genotipe padi berdasarkan hasil analisis *STRUCTURE* versi 2.3.4. disajikan pada Gambar 2.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kelompok padi yang berisi 100% padi tipe *japonica* adalah Nipponbare, Gajah Mungkur, Rojolele, dan Inpago 9. Kelompok padi yang berisi 100% padi tipe *indica* adalah Hawara Bunar, Kartuna, IR74, IR20, Gata, IR36, Cisadane, Krueng Aceh, Singkarak, Tondano, Arias, Maninjau, IR64, Danau Atas, Batur, Poso, Jatiluhur, Towuti, Limboto, Way Rarem, Ciherang, Angke, Danau Gaung, Batu Tegi, Silugonggo, Pandan Wangi, Inpago 5, dan Inpago 7. Dua puluh varietas lainnya berisi padi tipe *indica-japonica* dengan komposisi genom tercampur dengan komposisi yang berbeda-beda, ada yang didominasi oleh genom padi tipe *japonica*, dan ada juga yang didominasi oleh genom padi tipe *indica*.

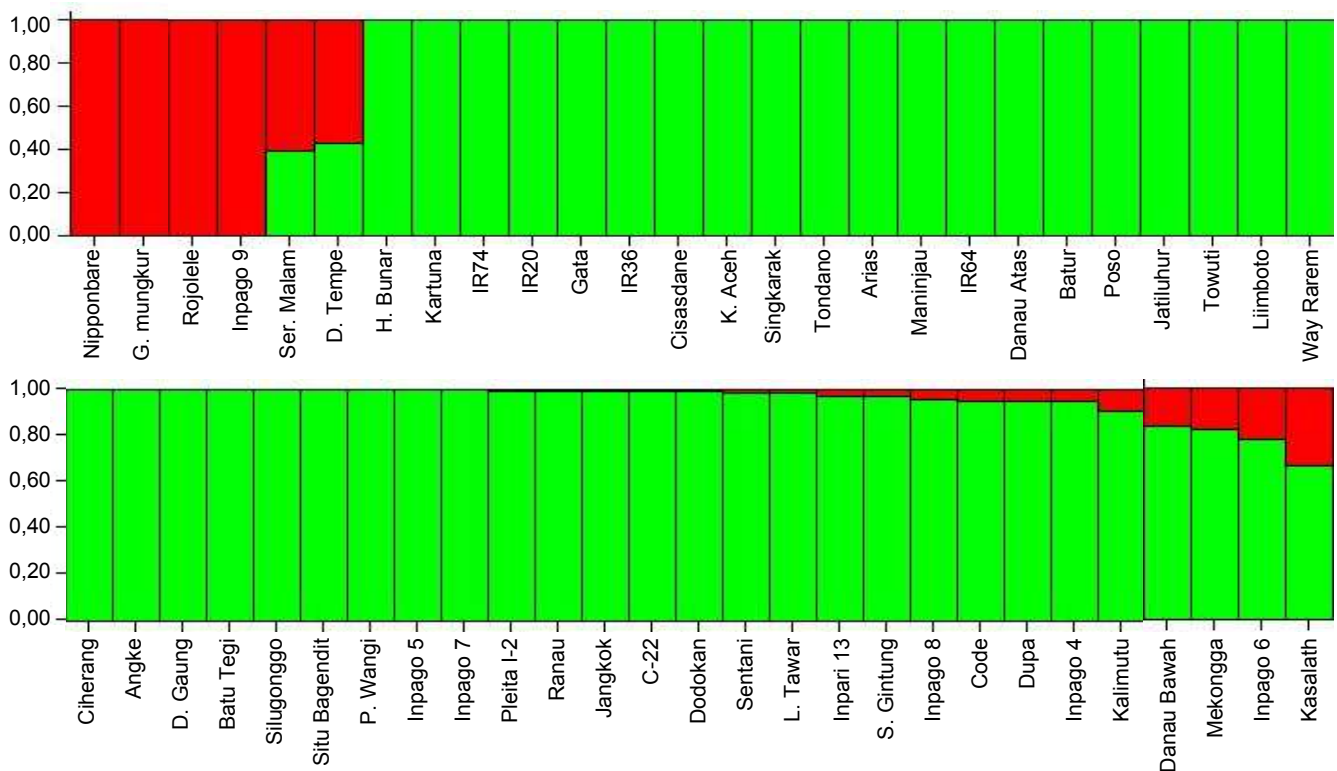
Umumnya padi tipe *indica* memiliki postur tinggi, bulir yang panjang, tidak lengket ketika ditanak, dan tumbuh di daerah tropis, seperti Indonesia, Filipina, dan India. Padi tipe *japonica* memiliki postur pendek, bulir bundar/gendut, lengket ketika ditanak, dan tumbuh di daerah subtropis, seperti Cina, Jepang, dan Korea. Padi *javanica* atau *tropical japonica* memiliki postur tinggi, kaku, memiliki daun hijau muda yang lebar, bulir padi panjang, lebar, dan tebal, serta tidak mudah pecah (<https://id.wikipedia.org/wiki/Padi>).

Hawara Bunar dan Dupa menurut Hairmansis et al. (2005) termasuk padi *tropical japonica* berdasarkan karakter morfologisnya. Hawara Bunar berdasarkan hasil analisis struktur populasi menggunakan program *STRUCTURE* adalah memiliki genom 100% padi tipe *indica*, sedangkan Dupa yang memiliki genom campuran padi tipe *indica-japonica* (Gambar 2) mungkin dapat dikelompokkan sebagai padi *tropical japonica*. Berdasarkan bentuk bulirnya, Dupa memiliki bentuk bulir bulat pendek, sebagaimana

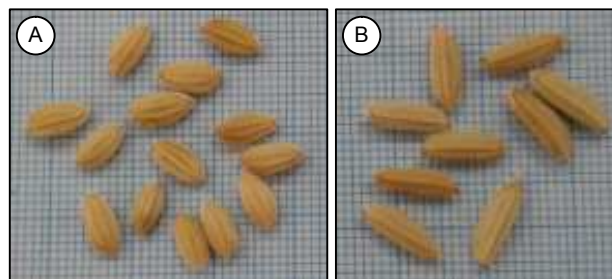
tipe bulir padi *japonica*. Sementara itu, Hawara Bunar memiliki tipe bulir yang lebih mirip padi tipe *indica*, tetapi sedikit lebih lebar (Gambar 3).

IR64 dan Ciherang sebagai varietas padi populer yang ditanam pada skala luas oleh petani di Indonesia memiliki genom yang 100% padi tipe *indica*. IR64 merupakan hasil persilangan IR5657/IR2061 dan introduksi dari IRRI (dilepas di Indonesia sebagai varietas baru pada tahun 1986), sedangkan Ciherang merupakan hasil persilangan IR18349-53-1-3-1-3/3*IR19661-131-3-1-3//4*IR64 (dilepas pada tahun 2000) (Suprihatno et al. 2010). Ciri-ciri yang dimiliki kedua varietas tersebut menunjukkan ciri-ciri padi *indica*, seperti bulirnya tidak berbulu, gabahnya panjang, dan nasinya pulen. Varietas unggul Indonesia ternyata ada yang memiliki genom 100% tipe *japonica*, seperti varietas Gajah Mungkur dan Inpago 9. Gajah Mungkur merupakan padi gogo yang diintroduksi dari Kenya. Padi ini terkenal sangat toleran terhadap kekeringan. Namun, iklim Kenya dominan seperti daerah tropis dengan dua musim (kemarau dan hujan), terletak pada derajat lintang $4^{\circ}\text{LU}-4^{\circ}\text{LS}$. Semestinya genom varietas Gajah Mungkur adalah 100% tipe *indica* karena beradaptasi baik di daerah tropis seperti Indonesia. Hal ini dapat terjadi kemungkinan di masa lalu padi ini sebenarnya berasal dari dan beradaptasi di daerah subtropis yang kemudian mengalami domestifikasi di daerah tropis dengan tanpa ada perubahan berarti pada susunan genomnya. Menurut deskripsi padi (Romdon et al. 2014), Gajah Mungkur memiliki bulir dengan bentuk medium, sedangkan IR64 memiliki bentuk ramping. Dari aspek bentuk bulirnya, Gajah Mungkur diindikasikan memiliki genom padi tipe *japonica*.

Inpago 9 merupakan padi gogo hasil persilangan di Indonesia. Wahab et al. (2017) melaporkan bahwa Inpago 9 yang dilepas pada tahun 2012 merupakan hasil persilangan UPLRI/IRAT15 dengan bentuk gabah bulat besar (mirip padi tipe *japonica*). Berdasarkan bentuk gabahnya, kedua varietas padi ini memang memiliki kecenderungan sebagai padi dengan genom tipe *japonica*. Rojolele sebagai padi lokal yang ditanam spesifik di daerah Delanggu, Klaten (Jawa Tengah) memiliki bentuk gabah yang bulat, mirip dengan padi *japonica*. Genom Rojolele ternyata memang 100% tipe *japonica*. Genotipe padi lain yang memiliki susunan genom campuran *indica-japonica* menunjukkan tetua yang digunakan sebagian dari padi tipe *japonica*. Batasan persentase alel untuk menentukan jenis padi tipe *indica* atau *japonica* memang belum tersedia. Apabila diambil batasan 80%, Pelita I-2 sampai dengan Inpago 6 (total 46 genotipe padi yang dianalisis pada penelitian ini)



Gambar 2. Keragaan genom setiap genotipe padi hasil analisis struktur populasi menggunakan program *STRUCTURE* dengan $K = 2$. ■ = genom padi tipe *japonica*, ■ = genom padi tipe *indica*.



Gambar 3. Bentuk bulir padi Dupa (A) dan Hawara Bunar (B).

(Gambar 2) termasuk padi tipe *indica*. Kasalath yang memiliki genom campuran 70% *indica* dan 30% *japonica* telah diidentifikasi sebagai padi tipe *aus* (Gamuyao et al. 2012). Padi Seratus Malam dan Danau Tempe mungkin dapat dimasukkan ke dalam padi tipe *tropical japonica* karena memiliki genom *indica-japonica* dengan komposisi yang hampir sama, yaitu 50% *indica* dan 50% *japonica*.

Penggunaan marka SNP pada analisis diversitas genetik berbagai genotipe padi hasil penelitian ini ternyata dapat mengubah pandangan tipe padi yang hanya didasarkan pada karakter morfologis (bentuk gabah, warna daun, dll.). Dengan penggunaan 6K marka SNP (Yu et al. 2014) dan 50K marka SNP yang saat ini mulai dikembangkan (Singh et al. 2015), diharapkan genom padi akan dapat dipelajari secara

lebih menyeluruh. Dengan semakin banyaknya marka SNP yang digunakan untuk analisis genetik, ke depannya tipe dan asal usul padi kemungkinan akan dapat disingkap secara lebih jelas dan lebih komprehensif.

KESIMPULAN

Marka SNP yang digunakan lokasinya terdistribusi pada dua belas kromosom yang mencakup jarak total 945.178,27 bp dengan nilai PIC 0,00 sampai dengan 0,588. Nilai PIC yang tinggi dimiliki oleh 96 marka SNP. Alel minor yang menunjukkan pola alel spesifik diperoleh sebanyak 10.972 alel.

Dendrogram hasil analisis 53 varietas padi menggunakan 4.606 marka SNP menunjukkan tiga kelompok dengan kelompok 1 dan 2 didominasi oleh

padi tipe *japonica*, sedangkan kelompok 3 didominasi oleh padi tipe *indica*, walaupun terdapat beberapa kelompok kecil yang berisi campuran antara padi tipe *indica* dan *japonica*, tidak ada kelompok yang secara tegas berisi *indica* atau *japonica* saja.

Apabila diambil batasan 80% pada analisis struktur populasi, 53 genotipe padi yang digunakan pada penelitian ini mengelompokkan 4 genotipe padi tipe *japonica*, 2 genotipe padi tipe *tropical japonica*, 46 genotipe padi tipe *indica*, dan 1 genotipe padi tipe *aus*.

Padi varietas Gajah Mungkur, Rojolele, dan Inpago 9 termasuk padi tipe *japonica*, IR64 dan Ciherang memiliki genom tipe *indica*. Dupa dan Hawara Bunar yang biasanya dikelompokkan ke dalam padi tipe *tropical japonica* ternyata termasuk padi tipe *indica*, bahkan Hawara Bunar memiliki 100% tipe *indica*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek *Generation Challenge Programme* dengan judul *Drought from a Different Perspective: Improved Tolerance through Phosphorus Acquisition* TA 2013/2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3), 314–331.
- Chen, H., He, H., Zou, Y., Chen, W., Yu, R., Liu, X., Yang, Y., Gao, Y.M., Xu, J.L., Fan, L.M., Li, Y., Li, Z.K. & Deng, X.W. (2011) Development and application of a set of breeder-friendly SNP markers for genetic analyses and molecular breeding of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 123 (6), 869–879.
- Chen, H., Xie, W., He, H., Yu, H., Chen, W., Li, J., Yu, R., Yao, Y., Zhang, W., He, Y., Tang, X., Zhou, F., Deng, X.W. & Zhang, Q. (2014) A high-density SNP genotyping array for rice biology and molecular breeding. *Molecular Plant*, 7 (3), 541–553.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19–21.
- Gamuyao, R., Chin, J.H., Pariasca-Tanaka, J., Pesaresi, P., Catausan, S., Dalid, C., Loedin, I.S., Mendoza, E.M.T., Wissuwa, M. & Heuer, S. (2012) The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. *Nature*, 488, 535–539.
- Ge, S., Oliveira, G.C.X., Schaal, B.A., Gao, L.Z. & Hong, D.Y. (1999) RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*, 82, 638–644.
- Gonzaga, Z.J., Aslam, K., Septiningsih, E.M. & Collard B.C.Y. (2015) Evaluation of SSR and SNP markers for molecular breeding in rice. *Plant Breeding and Biotechnology*, 3 (2), 139–152.
- Hairmansis, A., Aswidinnoor, H., Trikoesoemaningtyas & Suwarno (2005) Evaluasi daya pemulih kesuburan padi lokal dari kelompok *tropical japonica*. *Buletin Agronomi*, 33 (3), 1–6.
- Hu, W., Wen, M., Han, Z., Tan, C. & Xing, Y. (2013) Scanning QTLs for grain shape using a whole genome SNP array in rice. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 1 (1), 1–5.
- IRRI (2017) *The International Rice Genebank*. [Online] Available from: <http://irri.org/our-work/research/genetic-diversity/international-rice-genebank> [Accessed 25 October 2017].
- IRRI Genotyping Services Laboratory (2017) *7k Infinium SNP genotyping*. [Online] Available from: <http://gsl.irri.org/genotyping/infinium-7k> [Accessed 25 October 2017].
- Jeong, I.S., Yoon, U.H., Lee, G.S., Ji, H.S., Lee, H.J., Han, C.D., Hahn, J.H., An, G. & Kim, T.H. (2013) SNP-based analysis of genetic diversity in anther-derived rice by whole genome sequencing. *Rice*, 6 (6), 1–12. doi: 10.1186/1939-8433-6-6.
- Kim, C.K., Yoon, U.H., Lee, G.S., Lee, H.K., Kim, Y.H. & Hahn, J.H. (2009) Rice genetic marker database: An identification of single nucleotide polymorphism (SNP) and quantitative trait loci (QTL) markers. *African Journal of Biotechnology*, 8 (13), 2963–2967.
- Kim, S.I. & Tai, T.H. (2013) Identification of SNPs in closely related *temperate japonica* rice cultivars using restriction enzyme-phased sequencing. *PLoS One*, 8 (3), e60176. doi: 10.1371/journal.pone.0060176.
- Lestari, P., Utami, D.W., Rosdianti, I. & Sabran, M. (2016) Morphological variability of Indonesian rice germplasm and the associated SNP markers. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28 (9), 660–670.
- Liu, K. & Muse, S.V. (2005) PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic maker analysis. *Bioinformatics*, 21 (9), 2128–2129.
- Mammadov, J., Aggarwal, R., Buyyarapu, R. & Kumpatla, S. (2012) SNP markers and their impact on plant breeding. *International Journal of Plant Genomics*, 2012. doi: 10.1155/2012/728398.
- Masuduzzaman, A., Haque, M., Ahmed, M.M.E. & Mohapatra, C.K. (2016) SSR marker-based genetic diversity analysis of tidal and flood prone areas in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, 6 (3), 1–9. doi: 10.4172/2155-952X.1000241.
- McCouch, S.R., Zhao, K., Wright, M., Tung, C.W., Ebana, K., Thomson, M., Reynolds, A., Wang, D., DeClerck, G., Ali, Md.L., McClung, A., Eizenga, G. & Bustamante,

- C. (2010) Development of genome-wide SNP assays for rice. *Breeding Science*, 60 (5), 524–535.
- McNally, K.L., Childs, K.L., Bohnert, R., Davidson, R.M., Zhao, K., Ulat, V.J., Zeller, G., Clark, R.M., Hoen, D.R., Bureau, T.E., Stokowski, R., Ballinger, D.G., Frazer, K.A., Cox, D.R., Padhukasahasram, B., Bustamante, C.D., Weigel, D., Mackill, D.J., Bruskiewich, R.M., Ratsch, G., Buell, C.R., Leung, H. & Leach, J.E. (2009) Genome-wide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (30), 12273–12278.
- Milne, I., Shaw, P., Stephen, G., Bayer, M., Cardle, L., Thomas, W.T.B., Flavell, A.J. & Marshall, D. (2010) Flapjack—graphical genotype visualization. *Bioinformatics*, 26 (24), 3133–3134.
- Nei, M., Tajima, F. & Tateno, Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. *Journal of Molecular Evolution*, 19 (2), 153–170.
- Parida, S.K., Mukerji, M., Singh, A.K., Singh, N.K. & Mohapatra, T. (2012) SNPs in stress-responsive rice genes: Validation, genotyping, functional relevance, and population structure. *BMC Genomics*, 13, 426. doi: 10.1186/1471-2164-13-426.
- Prasetyono, J. & Hidayatun, N. (2017) Keragaman genetik padi lokal Indonesia toleran keracunan aluminium menggunakan marka *Single Nucleotide Polymorphism*. Dalam: Rosmaina, Isnaini, Fitmawati, Hidayati & Isda, M.N. (editor) *Strategi Pemuliaan dalam Mengantisipasi Perubahan Iklim Global*. Prosiding Seminar Nasional Perhimpunan Ilmu Pemuliaan Indonesia (Peripi), Pekanbaru, 20 Juli 2016. hlm. 417–424.
- Romdon, A.S., Kurniyati, E., Bahri, S. & Pramono, J. (2014) *Kumpulan deskripsi varietas padi*. Jawa Tengah, Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Tengah.
- Salgotra, R.K., Gupta, B.B., Bhat, J.A. & Sharma, S. (2015) Genetic diversity and population structure of basmati rice (*Oryza sativa* L.) Germplasm collected from North Western Himalayas using trait linked SSR markers. *PLoS One*, 10 (7), e0131858. doi: 10.1371/journal.pone.0131858.
- Singh, N., Choudhury, D.R., Singh, A.K., Kumar, S., Srinivasan, K., Tyagi, R.K., Singh, N.K. & Singh, R. (2013) Comparison of SSR and SNP markers in estimation of genetic diversity and population structure of Indian rice varieties. *PLoS One*, 8 (12), e84136. doi: 10.1371/journal.pone.0084136.
- Singh, N., Jayaswal, P.K., Panda, K., Mandal, P., Kumar, V., Singh, B., Mishra, S., Singh, Y., Singh, R., Rai, V., Gupta, A., Sharma, T.R. & Singh, N.K. (2015) Single-copy gene based 50K SNP chip for genetic studies and molecular breeding in rice. *Scientific Reports*, 5, 11600. doi: 10.1038/srep11600.
- Stanford University (2012) *Structure* 2.3.4. [Online] Available from: https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/structure_software/release_versions/v2.3.4/html/structure.html [Accessed 5 October 2014].
- Tasliyah, Prasetyono, J., Dadang, A., Bustamam, M. & Moeljopawiro, S. (2011) Studi agronomis dan molekuler padi umur genjah dan sedang. *Berita Biologi*, 10 (5), 663–673.
- Tasma, I.M. (2014) *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) sebagai marka DNA masa depan. *Warta Biogen*, 10 (3), 7–10.
- Utami, D.W. & Hanarida, I. (2014) Evaluasi lapang dan identifikasi molekuler plasma nutfah padi terhadap keracunan Fe. *Jurnal AgroBiogen*, 10 (1), 9–17.
- Utami, D.W., Rosdianti, I., Lestari, P., Satyawan, D., Rijzaani, H. & Tasma, I.M. (2013) Development and application of 1536-plex single nucleotide polymorphism marker chip for genome-wide scanning of Indonesian rice germplasm. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 14 (2), 71–78.
- Wahab, M.I., Satoto, Rachmat, R., Guswara, A. & Suharno (2017) *Deskripsi varietas unggul baru padi*. Jakarta, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Wang, L., Hao, L., Li, X., Hu, S., Ge, S. & Yu, J. (2009) SNP deserts of Asian cultivated rice: Genomic regions under domestication. *Journal of Evolutionary Biology*, 22 (4), 751–761.
- Yu, H., Xie, W., Li, J., Zhou, F. & Zhang, Q. (2014) A whole-genome SNP array (RICE6K) for genomic breeding in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 12 (1), 28–37.
- Zhang, P., Li, J., Li, X., Liu, X., Zhao, X. & Lu, Y. (2011) Population structure and genetic diversity in a rice core collection (*Oryza sativa* L.) investigated with SSR markers. *PLoS One*, 6 (12), e27565. doi: 10.1371/journal.pone.0027565.